

AQ

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

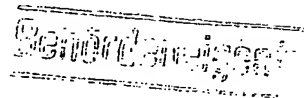


DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Off nlegungsschrift**
⑪ **DE 3436637 A1**

⑤1 Int. Cl. 4:
A61 K 45/02
A 61 K 45/06
A 61 K 35/14

②1 Aktenzeichen: P 34 36 637.7
②2 Anmeldetag: 5. 10. 84
④3 Offenlegungstag: 10. 4. 86



DE 3436637 A1

⑦1 Anmelder:
Bioferon biochemische Substanzen GmbH & Co,
7958 Laupheim, DE

⑦4 Vertreter:
Schwabe, H., Dipl.-Ing.; Sandmair, K., Dipl.-Chem.
Dr.jur. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑦2 Erfinder:
Brzoska, Josef, Dr., 7958 Laupheim, DE; Obert,
Hans-Joachim, Dr., 7959 Burgrieden, DE

⑤6 Recherchenergebnisse nach § 43 Abs. 1 PatG:
DE-OS 30 01 585
EP 1 07 498

⑤4 Verwendung von Interferon-gamma (IFN-gamma) enthaltenden Präparationen zur Behandlung von Schmerzen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Interferon-gamma (IFN-gamma) enthaltenden Präparationen zur kurzfristigen Beseitigung von Schmerzen. Zur Schmerzbeseitigung kann das Interferon entweder als Bolus oder bis zu einer 24-stündigen Dauerinfusion intravenös sowie intramuskulär, subkutan, intrakutan, intraartikulär oder intrathekal verabreicht werden. Je nach Schwere der Erkrankung werden 200 bis 2000 Millionen Internationale Einheiten als einmalige oder mehrmalige Injektion bzw. Infusion gegeben. Eine Schmerzbeseitigung wird bei Viruserkrankungen, Krebserkrankungen, rheumatischen Erkrankungen und Erkrankungen mit nicht gesicherter Genese wie Morbus Crohn erreicht.

DE 3436637 A1

05.10.84

3436637

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verwendung von Interferon-Gamma enthaltenden Präparationen zur Behandlung von Schmerzen.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung von Oberflächenschmerz, Tiefenschmerz und visceralem Schmerz.
3. Verwendung nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Interferon-gamma enthaltende Präparation zusätzlich andere Interferone und/oder andere durch Leukozyten gebildete Mediatoren enthält.
4. Verwendung von Interferon-gamma enthaltenden Präparationen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Präparationen in einer intravenös, intramuskulär, subkutan, intrakutan, intraartikulär oder intrathekal zu verabreichenden Applikationsform vorliegen.
5. Verwendung von Interferon-gamma enthaltenden Präparationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Verabreichungsform 200 bis 2.000 Millionen Internationale Referenzeinheiten (entspr. 1 ng bis 10 mg) Interferon-gamma aufweist.

Alle bekannten Interferone werden auf Grund von Homologien sowohl zwischen den Nukleotidsequenzen ihrer Strukturgene als auch zwischen ihren Aminosäuresequenzen eindeutig in drei Gruppen eingeteilt, die als IFN-alpha, IFN-beta und IFN-gamma bezeichnet werden.

Die verwendeten Bezeichnungen folgen der neuesten Empfehlung des "Interferon Nomenclature Committee", die von J. Vilcek 1983 in Archives of Virology Vol. 77, S. 283-285 veröffentlicht wurden. Zusätzlich zu den genannten Hauptkriterien kann zur Charakterisierung der IFN-gamma Gruppe herangezogen werden, daß keine immunologische Kreuzreaktion mit den beiden anderen Gruppen erfolgt sowie ihre biologische Instabilität bei pH 2 im Gegensatz zu IFN-alpha und IFN-beta.

IFN-gamma wird in einem komplexen Prozeß von den T-Lymphozyten des Immunsystems auf Stimulation mit Mitogenen oder spezifischen Antikörpern zusammen mit einer Reihe anderer Faktoren (Mediatoren) ausgeschüttet, weshalb es auch mit diesen zusammen als Lymphokin bezeichnet wird. Darüber hinaus existieren etablierte bzw. transformierte Zelllinien, die IFN-gamma konstitutiv produzieren, wie von N. Fujii et al. in J. Immunology 130, S. 1683-1686, und A. Zlotnik et al. in J. Immunology 131, S. 794-800, beschrieben.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Gewinnung von humanem Roh-IFN-gamma wird nachfolgend beschrieben. Als Ausgangsmaterial dienen lymphozytenreiche Plasmafraktionen von Blutkonserven, sogenannte "buffy coats", die gepoolt und durch schonende Zentrifugation bei 600 - 800 g von Plasmaresten befreit werden. Die pelletierten Gesamtleukozyten werden in vorgewärmtem Medium mit einer Dichte von 5 Millionen Zellen/ml suspendiert. Die Zellsuspension wird in aliquots in geeigneten Kultivierungsgefäßen nach Zugabe eines Mitogens (z.B. Phyt-hämagglutinin) und Phorbol-ester (z.B. Phorbolmyristylacetat (PMA)) bis zu 70 Stunden bei 37 Grad C auf einem Schüttler inkubiert. Die IFN-gamma-haltigen Kulturüberstände werden

durch Zentrifugation gewonnen und können bis zur Weiterverwendung bei 4 Grad C gelagert werden. Üblicherweise enthalten die so gewonnenen Präparationen etwa 10.000 Internationale Referenzeinheiten IFN-gamma pro ml.

Der IFN-gamma Gehalt wird durch einen CPE-Reduktionstest in geeigneten Indikatorzellen (z.B. WISH) mit einem Testvirus (z.B. EMC der Maus) gegen den Referenzstandard Gg 23-201-530 des National Institute of Health (USA) als antivirale Aktivität des Präparates bestimmt.

Weitere Methoden zur Gewinnung von IFN-gamma Präparationen werden von Y. K. Yip et al. in "Infection and Immunity", Oct. 1981, S. 131-139, Vol. 34 und in den US-PS 4376822 sowie 4376821 beschrieben.

Ein grundsätzlich anderer Weg zur Gewinnung von humanen IFN-gamma- Präparationen wird mit der Rekombination eines Strukturgens in geeignete Wirtszellen und die Expression dieses Gens beschritten. Auch wenn es sich bei dem Strukturgen um eine eindeutige definierte Sequenz aus Nukleotiden handelt, ist die Zusammensetzung des mit Hilfe der Wirtszelle hergestellten Präparates nicht notwendigerweise mit einem natürlich vorkommenden humanen IFN-gamma identisch.

Als Wirtszellen zur Aufnahme des Humangens können Bakterien dienen (z.B. E.coli wie von G. Simons et al. in Gene 28, S. 55-64, 1984, beschrieben) oder Hefen (z.B. Saccharomyces cerevisiae wie von R. Derynck et al. in Nucleic Acid Research 11, S. 1819-1837, 1983, beschrieben) oder eukaryotische Zellen (wie z.B. Chinese Hamster Ovary Cells wie von S. J. Scahill et al. in Proc. Acad. Sci. USA 80, S. 4654-4658, 1983, Affenzellen wie von P. W. Gray et al. in Nature 295, S. 503-508, 1982, beschrieben).

In einigen von diesen Systemen reichert sich entweder IFN-gamma in der Kulturflüssigkeit an und erreicht mehr als 100.000 Internationale Referenzeinheiten pro ml oder es wird im Wirt selbst angereichert und stellt dort bis zu 25 Prozent des Proteingehalts der Zelle dar.

Die Anreicherung bzw. Reinigung der nach den vorstehend

beschriebenen Verfahren erhaltenen IFN-gamma Präparationen kann nach den folgenden Methoden einzeln oder in Kombination erfolgen:

1. Controlled Pore Glass (CPG) oder Silica-Gel;
2. Gelfiltration (z.B. AcA 54 oder Sephacel S 200);
3. Ionenaustauschchromatographie (CM-Sepharose oder Phosphocellulose oder DEAE-cellulose);
4. Affinitätschromatographie (Con A-Sepharose oder Poly-U-Sepharose oder Cu-Chelat-Sepharose);
5. Immunaффinitätschromatographie (Anti-IFN-gamma-Sepharose);
6. HPLC (RP 8).

Entsprechende Verfahren wurden von Y. K. Yip et al. "Partial Purification and Characterization of Human Gamma (Immune) Interferon" in Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78, S. 1601-1605, 1981 oder von D. Novick et al., EMBO Journal 2, S. 1527-1530, 1984 oder in der DE-PS 31 36166 A 1 beschrieben.

Durch geeignete Kombinationen ist eine Reinigung bis zur elektrophoretischen Homogenität möglich, z. Zt. liegt die dabei erreichte spezifische Aktivität bei 100 - 200 Millionen Internationalen Referenzeinheiten.

Klinisch werden gewöhnlich Präparate eingesetzt, die 100.000 - 200 Millionen Internationale Referenzeinheiten pro mg Protein enthalten, d. h. 1 Microgramm Wirkstoff enthält bis zu 200.000 Internationale Referenzeinheiten.

Wie die anderen Interferone ist auch IFN-gamma eine Substanz mit antiviraler, antiproliferativer und immunmodulierender Wirkung. Aufgrund seiner in vitro stärkeren antiproliferativen Wirkung als IFN-alpha und IFN-beta wurde es bisher nahezu ausschließlich bei Patienten mit malignen Erkrankungen eingesetzt (Came, P. E. und Carter, W. A.: Interferons and their applications. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984; De Maeyer, E. D. und Schellekens, H. (Hrsg.): The biology of the interferon system 1983. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, New York, Oxford, 1983).

5.

Schmerzen stellen sehr unangenehme Empfindungen dar, Schmerzen tun weh. Nach der Herkunft werden drei verschiedene Arten unterschieden: Oberflächenschmerz (ausgehend von der Haut), Tiefenschmerz (ausgehend von Muskeln, Knochen, Gelenken und Bindegewebe) und visceraler Schmerz (ausgehend von den Eingeweiden). Schmerzen werden durch gewebsschädigende Reize (Noxen) erzeugt. Diese können mechanischer, thermischer oder chemischer Art sein. Diskutiert wird die Möglichkeit, ob für alle Schmerzen ein gemeinsamer Schmerzstoff verantwortlich ist, der durch die Noxen aus den Geweben freigesetzt wird (Schmidt, R.F.: Somato-viscerale Sensibilität: Hautsinne, Tiefensensibilität, Schmerz. In: Schmidt, R.F., Thews, G. (Hrsg.) Physiologie des Menschen. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 1980). Für die Schmerztherapie kommen in Betracht: Lokalanästhesie, Leitungsanästhesie, Lumbalanästhesie, Analgetika, Narkose, psychische Einwirkung, Devitalisation, Neurektomie, Chordotomie und Thalamotomie (Hensel, A.: Somato-viszerale Sensibilität. In: Keidel, W.D. (Hrsg.) Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie. Thieme Verlag: Stuttgart, 1979).

Der bisherige Kenntnisstand ist, daß bei einer Therapie mit Interferonen in vielen Fällen als Nebenwirkungen Schmerzen auftreten. Nur beim Herpes zoster bewirkt eine Behandlung mit IFN-beta eine deutliche Linderung der Schmerzen (Heide- mann, E. et al.: Günstiger Verlauf des Herpes zoster bei immunsupprimierten Patienten unter Behandlung mit Fibroblasten- interferon. Onkologie 7, 210-212, 1984). Dies ist aber nicht verwunderlich, da die Erkrankung und die Schmerzen auf die Reaktivierung eines Virus in den sensiblen Nervenfasern zurückgehen. Durch die Therapie des Herpes zoster mit IFN-beta wird die Ausbreitung des Exanthems gestoppt und die Abheilung der Effloreszenzen beschleunigt, was mit einem Verschwinden der Schmerzen einhergeht.

Im Rahmen unserer klinischen Prüfungen mit natürlichen und rekombinanten IFN-gamma enthaltenden Präparationen konnte unerwartet gefunden werden, daß diese Substanzen Schmerzen innerhalb kurzer Zeit beseitigen können. Das trifft für alle bisher geprüften Erkrankungen zu: Viruserkrankungen, Krebserkrankungen, rheumatische Erkrankungen und Erkrankungen mit nicht gesicherter Genese wie Morbus Crohn.

nach einer Injektion die Schmerzen anhaltend beseitigt und die Patienten in ihrer Motorik nur noch wenig oder überhaupt nicht mehr eingeschränkt sind. Dieses Ergebnis überrascht, da die bisher klinisch gesicherten Wirkungen der Interferone dies nicht vermuten ließen.

Natürliches IFN-gamma und rekombinantes IFN-gamma können wie folgt dosiert werden:

Die Substanzen können als Bolus oder bis zu einer 24-stündigen Dauerinfusion intravenös sowie intramuskulär (einschl. paravertebral bzw. periartikulär), subkutan, intrakutan, intraartikulär oder intrathekal verabreicht werden.

Bei allen Applikationen werden je nach Schwere der Erkrankung gegeben: 200 bis 2.000 Millionen Internationale Einheiten als einmalige Injektion bzw. Infusion. Bei mehrmaliger Gabe kann diese Dosis

- a) an aufeinanderfolgenden Tagen
- b) alle 2 bis 6 Tage
- c) einmal pro Woche
- d) alle zwei bis vier Wochen
- e) einmal pro Monat oder
- f) jedesmal bei Auftreten von Schmerzen

injiziert bzw. infundiert werden.

Für die praktische Anwendung empfiehlt es sich, die Behandlung mit niedrigen Dosen, beispielsweise mit Dosen von 20.000 bis 2.000.000, jeweils abhängig vom Körpergewicht, die Therapie zu beginnen.

Zur Steigerung der Effektivität der Interferon-gamma-Präparation können folgende Substanzen zusätzlich gegeben werden:

- a) andere Interferone und/oder andere von Leukozyten gebildete Mediatoren
- b) in der Therapie bisher verwendete Antirheumatika.

Zur Herstellung der jeweiligen Darreichungsform werden die dem Fachmann bekannten Hilfsstoffe verwendet.

Beispiel 1

Patient: N. N.
Diagnose: Zoster oticus
Substanz: humane IFN-gamma-Präparation aus menschlichen Leukozyten
Applikationsweise: intramuskulär
Therapieschema: 0.5×10^6 I.E. über 5 Tage
Ergebnis: Der Patient war innerhalb von 3 Tagen schmerzfrei.

Beispiel 2

Patient: G. Sch., männl., 57 Jahre
Diagnose: Hypernephrom mit Knochenmetastase im Oberarmschaft rechts. Oberarm kann aufgrund der starken Schmerzen nicht bewegt werden.
Substanz: humane IFN-gamma-Präparation aus E. coli
Applikationsweise: intramuskulär
Therapieschema: jeweils viermal pro Woche IFN-gamma in steigender Dosis bis zu 1600 µg, beginnend mit 100 µg in der ersten Woche.
Ergebnis: Bereits eine halbe Stunde nach der 1. Injektion fühlte sich der Patient schmerzfrei und konnte wieder mit dem rechten Arm Bewegungen ausführen, die früher nicht möglich waren. Der Patient steht wegen des Hypernephroms noch unter Therapie und ist weiterhin schmerzfrei.

Beispiel 3

Patient: Lu. männl.

Diagnose: schwere chronische Polyarthrititis seit über 10 Jahren, Deformation an Händen und Füßen, bei Einlieferung in die Klinik nicht bewegungsfähig, bisher keine Besserung des Leidens möglich.

Substanz: humane IFN-gamma-Präparation aus menschlichen Leukozyten

Applikationsweise: subkutan

Therapieschema:

Behandlungstag	Dosierung
1.	$0,1 \times 10^6$ I.E.
2.	$0,5 \times 10^6$ I.E.
3.	$0,5 \times 10^6$ I.E.
4.	$1,0 \times 10^6$ I.E.
5.	$1,0 \times 10^6$ I.E.
8.	$1,5 \times 10^6$ I.E.
9.	$1,5 \times 10^6$ I.E.
10.	$1,5 \times 10^6$ I.E.
11.	$1,5 \times 10^6$ I.E.

Ergebnis: Am 6. Behandlungstag zeigte sich eine wesentliche Besserung der Schmerzen in den unteren Extremitäten; ab dem 11. Behandlungstag war der Patient völlig schmerzfrei.

Beispiel 4

Patient: J.B., 44 Jahre, 57 kg

Diagnose: Morbus Crohn, Crohnindex* 290

Substanz: humane IFN-gamma-Präparation aus menschlichen Leukozyten

3436637

Applikationsweise: intramuskulär bzw. intravenös

Therapieschema und

Ergebnis:

Behandlungs- tag	Dosis I.E.x10 ⁶	Appl.- weise	Crohn- index
1.	0,02	i.m.	290
2.	0,03	i.m.	
3.	0,05	i.m.	
4.	0,1	i.m.	
8.	0,02	i.v.	239
9.	0,03	i.v.	
10.	0,05	i.v.	
11.	0,1	i.v.	
15.	0,1	i.m.	134
17.	0,1	i.m.	
19.	0,1	i.m.	
22.	0,1	i.v.	130
24.	0,1	i.v.	
26.	0,1	i.v.	
29.	0,2	i.m.	143
31.	0,2	i.m.	
33.	0,2	i.m.	
36.	0,2	i.v.	92
38.	0,2	i.v.	
40.	0,2	i.v.	
43.	0,5	i.m.	47
45.	0,5	i.m.	
47.	0,5	i.m.	
50.	0,5	i.v.	59
52.	0,5	i.v.	
54.	0,5	i.v.	